

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/009800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P7/00 C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 196 23 735 C1 (LUCAS MEYER GMBH & CO) 23 October 1997 (1997-10-23) * Siehe Seite 2, Zeilen 29-34 * -----	1-14

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 2005

Date of mailing of the international search report

12/10/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Korsner, S-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/009800

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19623735	C1 23-10-1997	EP ES	0812541 A2 2195051 T3	17-12-1997 01-12-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/009800

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P7/00 C12P7/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 196 23 735 C1 (LUCAS MEYER GMBH & CO) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) * Siehe Seite 2, Zeilen 29-34 *	1-14

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

5. Oktober 2005

12/10/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Korsner, S-E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/009800

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19623735 C1	23-10-1997 EP ES	0812541 A2 2195051 T3	17-12-1997 01-12-2003

- 1 -

Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Mono- und Diacylglycerid-haltigen Emulgatoren

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur enzymatischen

5 Herstellung Mono- und Diacylglycerid-haltiger Emulgatoren und deren
Verwendung.

Lecithine und Lysolecithine werden in verschiedenen Anwendungen als
Emulgatoren verwendet. Man findet sie in Lebensmitteln, Kosmetika,

10 Nahrungsergänzungsmitteln und chemischen Formulierungen.

Sie werden im Allgemeinen als Nebenprodukte der Ölgewinnung z. B. aus
Sojabohnen oder Raps gewonnen oder direkt aus dem entsprechenden
Rohstoff, wie z.B. Eigelb extrahiert. Lecithine und Lysolecithine stellen meist
eine komplexe Mischung aus Phospholipiden (1, 2-Diacylglycerinphosphat),
15 Lysophospholipiden (1- oder 2-Monoacylglycerinphosphat als
Hydrolysederivat von Phospholipiden), Glycolipiden und Triacylglyceriden
dar. Je nach Verarbeitungsprozess können die Gehalte der einzelnen
Fraktionen im Endprodukt stark schwanken.

20 Rohlecithin stellt ein nicht standardisiertes Lecithin dar, wie es z.B. in der
Ölmühle bei der Raffination von Pflanzenöl als Nebenprodukt anfällt. Der
Ausdruck Öl beinhaltet raffiniertes oder unraffiniertes Pflanzenöl, teilweise
oder vollständig gehärtetes (hydriertes) Pflanzenöl oder tierisches Fett,
deren aller Hauptkomponente Triacylglyceride sind.

25 Mono-, Di- und Triacylglyceride weisen ein, zwei oder drei Acylgruppen auf,
die einer langkettigen gesättigten oder ein- oder mehrfach ungesättigten
Fettsäure entstammen. Bevorzugt weisen die Acylgruppen 6 bis 35 C-
Atome, insbesondere 10 bis 30 C-Atome, und noch mehr bevorzugt 12 bis
30 26 C-Atome auf. Monoacylglyceride können 1- oder 2-Monoacylglyceride
sein, Diglyceride können 1,2- oder 1,3-Diacylglyceride darstellen.

- 2 -

Höhere Gehalte an Lysolecithinen können mit Hilfe einer enzymatischen Hydrolyse der entsprechenden Phospholipide durch Abspaltung eines oder zweier Fettsäurereste zu den entsprechenden Lysophospholipiden gewonnen werden.

5

Unter „Lysolecithin“ soll im vorliegenden Zusammenhang, wie auch im kommerziellen und lebensmittelrechtlichen Sinn eine Mischung aus enzymatisch teilhydrolysierten polaren Lipiden und neutralen Lipiden verstanden werden, die einen Anteil Acetonunlösliches von mindestens 56% aufweisen. Acetonunlösliches ist dabei einer der wichtigsten 10 Analysenparameter, der zur lebensmittelrechtlichen Beurteilung von Lecithin herangezogen wird und der den Anteil der polaren Lipide im Lecithin, die in Aceton nicht löslich sind, beschreibt.

15 Die Hydrolyse von Lipiden und Phospholipiden mit Lipasen und Phospholipasen ist gut beschrieben (Adlercreutz, Patrick, 1994: „Enzyme-catalyzed lipid modification“; Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 12, 231-254).

20 Darüber hinaus beschäftigt sich eine Vielzahl von Patentdokumenten ebenfalls mit der enzymatischen Hydrolyse von Phospholipiden zu Lysolecithinen.

25 EP-A 260573 beschreibt die Herstellung von Lysolecithin, indem ein Lecithin mit 5 - 30 Gew.-% Wasser versetzt und in Gegenwart eines Calciumsalzes sowie eines Lecithin hydrolysierenden Enzyms zu Lysolecithin umgesetzt wird.

30 In WO 91/03565 wird die Hydrolyse von isolierten Phospholipiden in organischen Lösemitteln mit Hilfe einer immobilisierten Lipase gelehrt, während EP-A 870840 die Hydrolyse einer wässrigen Lecithinlösung mit Phospholipasen beschreibt, bei der die entstehenden Lysophospholipide durch Lösemittelextraktion (Aceton) von Begleitstoffen befreit werden.

- 3 -

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung eines Lysolecithins ist in JP 10042884 beschrieben, wo das gewünschte Produkt durch Hydrolyse von Lecithin mittels Phospholipase A2 in einem Lösemittel/Wasser Gemisch hergestellt wird.

5

WO 97/28270 lehrt ein Verfahren zur Herstellung von Lysophosphatidylcholin aus dem Substrat Phosphatidylcholin mit Hilfe einer Phospholipase A2. Die Reaktion wird in einer Dispersion des Substrats mit einem weiteren Agens aus der Gruppe der Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Polyglycerol-, Saccharose- und Sorbitan-Fettsäureester sowie Glycerin in Gegenwart von Wasser durchgeführt.

Neben den Lecithinen und Lysolecithinen wirken auch Mono- und Diacylglyceride als Stabilisatoren für Emulsionen. Sie werden meist durch alkalische Verseifung von Triacylglyceriden bei hohen Temperaturen gewonnen. Sie müssen allerdings im Anschluss an diesen Hydrolyseschritt kostenintensiv aufgereinigt werden.

Eine alternative Methode zur Herstellung von Monoacylglyceriden beschreibt WO 02/11543. Mit Hilfe einer Lipase werden aus dem entsprechenden Triacylglycerid über 40 % als Monoacylglyceride in einem Polyol/Wasser-Gemisch erhalten. Lecithin wie auch Fette werden hierbei ausschließlich zur Erweiterung des Substratspektrums zugesetzt.

In der Regel werden die Mono- und Diacylglyceride zur Stabilisierung von Emulsionen in Kombination mit Lysolecithinen im Backwaren- und Margarinebereich eingesetzt. Dazu werden bisher die Einzelkomponenten meist getrennt hergestellt, aufgereinigt und in der gewünschten Konzentration gemischt.

WO 00/52190 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung einer Mischung von Lysolipiden, Lysophospholipiden, Monoacylglyceriden und Diacylglyceriden durch Reaktion von Lecithin in einem Wasser/Polyol-Gemisch in Gegenwart

- 4 -

einer Kombination aus Lipase und Phospholipase. Der Schwerpunkt liegt hierbei in der möglichst vollständigen Umsetzung der Phospholipide bei einer Umsetzungsrate von 80 % bezogen auf das Verhältnis von Lysophosphatidylcholin/Phosphatidylcholin. Durch den hohen Wassergehalt
5 der Reaktionslösung von ca. 60 % ist die Gewinnung des Endproduktes allerdings mit einem hohen Energie- und Kostenaufwand verbunden. Eine definierte Einstellung des Lysolecithin/Mono- und Diacylglycerid-Verhältnisses ist mit diesem Verfahren allerdings nicht möglich, da der Lysophospholipid-Anteil immer überwiegt und der Monoacylglycerid-Anteil
10 durch die Zugabe des Glycerins immer wesentlich höher ausfällt als der Diacylglycerid-Anteil.

Allerdings kann das Verhältnis zwischen Mono- und Diacylglyceriden sowie Lysophospholipiden im zu stabilisierenden Produkt in Abhängigkeit von der
15 jeweiligen Anwendung stark variieren. So werden bspw. zur Stabilisierung von Margarine Mono-/ Diacylglyceride und Lysolecithin im Verhältnis 1,7:1 zugegeben, wogegen im Bereich der Backwaren der Anteil des Lysolecithins überwiegt und die entsprechende Mischung im Verhältnis von 0,4:1 vorliegt.

20 Ausgehend von diesem Kenntnisstand hat sich für die vorliegende Erfindung die Aufgabe gestellt, ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Mono- und Diacylglycerid-haltigen Emulgatoren bereitzustellen, das ohne die sonst übliche Zugabe von Calcium, Polyolen oder organischen Lösemitteln eine kostengünstige Herstellung von Gemischen aus Mono- und
25 Diacylglyceriden sowie Lysophospholipiden erlaubt und das darüber hinaus eine flexible Einstellung des Verhältnisses zwischen Mono- und Diacylglyceriden sowie Lysophospholipiden durch Variation der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches oder der Reaktionsbedingungen ermöglicht.

30

Gelöst wurde diese Aufgabe mit einem entsprechenden Verfahren, bei dem

- a) eine Mischung aus einer Phospholipid- und einer Triacylglycerid-Komponente vorgelegt wird,

- 5 -

- b) zu der Mischung aus Verfahrensschritt a) eine solche Menge einer (Phospho-)Lipase-haltigen wässrigen Lösung gegeben wird, dass der Wassergehalt der Mischung zwischen 3 und 15 Gew.-% und insbesondere zwischen 5 und 12 Gew.-% beträgt, anschließend
- 5 c) die aus Verfahrensschritt b) erhaltene Mischung bei Temperaturen zwischen 20° und 80°C über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden zur Reaktion gebracht wird, und abschließend
- d) die Mischung nach dem Reaktionsende getrocknet wird.

10 Überraschend hat sich bei der erfindungsgemäßen gleichzeitigen Umsetzung von Phospholipiden (Lecithin) und Triacylglyceriden (Öl) zu Lysophospholipiden und Mono- sowie Diacylglyceriden herausgestellt, dass durch die Wahl der Parameter Temperatur, Inkubationszeit, Verhältnis zwischen Lecithin und Öl, Lecithin und Wasser bzw. Öl und Wasser
15 oder/und der Menge an zugesetztem Enzym die Zusammensetzung des Reaktionsproduktes exakt eingestellt werden kann. So ist es z.B. über das Verhältnis von Lecithin zu Öl, das sich über den Anteil an Acetonunlöslichem definieren lässt, möglich, bei einer Hydrolyse mit Lipase und einem bestimmten Wasseranteil, den Anteil von Monoacylglyceriden
20 und von 1,2-Diacylglyceriden am Gesamt-Mono-/Diacylglycerid-Anteil bei vergleichsweise konstantem Anteil von 1,3-Diacylglyceriden gezielt einzustellen. Alternativ kann aber auch über die Inkubationszeit bspw. bei einer Temperatur von 60°C mit 0,05 Gew.-% Lipase in einem Gemisch Rohlecithin/ Öl, mit einem Anteil an Acetonunlöslichem von 50%, mit einem
25 Wasseranteil von 10%, der Anteil von Monoacylglyceriden und von 1,3-Diacylglyceriden am Gesamt-Mono-/Diacylglycerid-Anteil variiert werden, wobei der Anteil an 1,2-Diacylglyceriden am Gesamt-Mono-/Diacylglycerid-Gehalt vergleichsweise konstant bleibt. Diese Vorteile waren unter Berücksichtigung der Einfachheit der Verfahrensführung in diesem Ausmaß
30 nicht zu erwarten.

Als Phospholipidkomponente hat sich erfindungsgemäß ein Lecithin und vorzugsweise Rohlecithin als besonders geeignet gezeigt, wobei ein Soja-

- 6 -

Rohlecithin als besonders bevorzugt anzusehen ist.

Pflanzliche und/oder tierische Öle, vorzugsweise in raffinierter und/oder

mindestens teilweise gehärteter Form sind im Rahmen der vorliegenden

- 5 Erfindung besonders geeignete Vertreter der Triacylglycerid-Komponente,
wie sie im Verfahrensschritt a) vorgelegt wird.

Hinsichtlich der Verfahrensführung kann in einer speziellen Variante im

Verfahrensschritt a) eine Mischung vorgelegt werden, die einen

10 Phospholipidkomponenten-Anteil zwischen 10 und 80 Gew.-% und/oder
einen Triacylglyceridkomponenten-Anteil zwischen 20 und 90 Gew.-%
aufweist. Das Gew.-Verhältnis zwischen Phospholipidkomponenten-Anteil
und Triacylglyceridkomponenten-Anteil beträgt vorteilhafterweise 1 : 0,25 bis
1 : 4.

15

Generell ist der Verfahrensschritt a) keiner besonderen Einschränkung
unterworfen, allerdings kann es unter gewissen Bedingungen vorteilhaft
sein, dass die Mischung im Verfahrensschritt a) auf eine Temperatur
zwischen 35° und 60°C gebracht wird, was die vorliegende Erfindung
ebenfalls berücksichtigt.

20 Hinsichtlich des Verfahrensschrittes b) ist es als bevorzugt anzusehen, wenn
eine Lipase und/oder Phospholipase mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise
aus *Candida* und/oder *Aspergillus* eingesetzt wird. Besonders geeignete
Stämme sind dabei *Aspergillus niger* und *Candida cylindracea*, wobei
natürlich auch jede andere geeignete Enzymquelle gewählt werden kann.

Wie bereits dargelegt, liegt ein großer Vorteil des vorliegenden Verfahrens

darin, dass das Verhältnis von Mono- und Diacylglyceriden im emulgierend

30 wirkenden Produkt gezielt einstellbar ist. Die Erfindung sieht deshalb auch
vor, dass im Verfahrensschritt b) eine (Phospho-)Lipase-Menge von 0,05 bis
10,0 mg pro ml-Reaktionsmischung und insbesondere 0,1 bis 5 mg pro ml-
Reaktionsmischung verwendet wird. Die jeweils gewünschte Enzymmenge

- 7 -

kann dabei selbstverständlich auch in Abhängigkeit von der Enzymaktivität eingesetzt werden, weshalb eine entsprechende Menge zwischen 0,1 und 120 u pro ml Reaktionsgemisch empfehlenswert ist. Allgemein kann das Verhältnis von Lipase zu Phospholipase in der eingesetzten Enzym-
5 Komponente in einem breiten Bereich variiert werden, wodurch gezielt Einfluss auf die Zusammensetzung des erhaltenen Produktes (des Emulgators) genommen werden kann.

Als bevorzugt ist im Hinblick auf den Verfahrensschritt c) eine Temperatur
10 anzusehen, die zwischen 40 und 50°C liegt. Die Reaktionsdauer im Verfahrensschritt c) sollte vorteilhafterweise zwischen 5 und 20 Stunden liegen und besonders bevorzugt zwischen 8 und 12 Stunden.

Der abschließende Trocknungsschritt d) ist im vorliegenden Verfahren wieder überhaupt nicht limitierend und kann mit jedem üblichen Verfahren durchgeführt werden. Es sollte allerdings auf schonende Bedingungen geachtet werden, weshalb Temperaturen besonders geeignet sind, die zwischen 60° und 80°C liegen. Die Durchführung der Trocknung im Vakuum ist besonders empfehlenswert.
20

Typischerweise wird das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt, indem Lecithin mit Öl in einem spezifischen Verhältnis vereint, auf eine Temperatur zwischen 35°-60°C temperiert und durch Rühren gemischt wird. Eine mögliche Quelle für das Lecithin ist dabei Rohlecithin aus Soja, wobei statt 25 Rohlecithin auch ein standardisiertes, entöltes oder fraktioniertes Lecithin verwendet werden kann. Als Öl kommen pflanzliche Öle, wie z.B. Sojaöl, oder ein hydriertes pflanzliches Öl, wie z.B. Palmfett, oder aber auch tierische Öle und Fette in Frage. Die Enzym-Komponente wird als Lipase in einer wässrigen Lösung zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben, wobei der 30 Gesamtanteil an Wasser bevorzugt im Bereich 6 bis 12 Gew.-% liegt. Mögliche Quellen für Lipase-Enzyme sind dabei insbesondere *Candida cylindracea* (vgl. Biocatalysts, Pontypridd, Wales) oder *Aspergillus niger* (vgl. Amano, Nagoya, Japan). Das Reaktionsgemisch wird anschließend bei einer

- 8 -

bestimmten Temperatur und für eine bestimmte Zeit gerührt, wobei die Temperatur z.B. im Bereich von 50°C liegen kann. Als Inkubationszeit ist bevorzugt eine Spanne zwischen 2 und 15 Stunden vorgesehen. Nach Ablauf dieser Reaktion wird das Gemisch unter Vakuum bei einer 5 Temperatur von ca. 70°C getrocknet, und das Produkt ggf. noch kristallisiert.

Als bevorzugtes Produkt wird von der vorliegenden Erfindung eine Mischung beansprucht, die aus Lysolecithin, Mono- und Diacylglyceriden besteht, wobei die bevorzugten Anteile bzgl. Lysolecithin zwischen 3,0 und 55 Gew.- 10 % und bzgl. der Monoacylglyceride zwischen 2,0 bis 20 Gew.-% liegen sollten. Im Hinblick auf den Diacylglycerid-Anteil werden Mengen empfohlen, die zwischen 6,0 und 40 Gew.-% liegen.

Alternativ sieht die Erfindung als Produkt aus dem beanspruchten Verfahren 15 ein Gemisch vor, bei dem das Verhältnis Phospholipid-Komponente zu der kombinierten Mono- und Diacylglycerid-Komponente 1 : 0,25 bis 4,0 beträgt.

Die Reaktionsprodukte können nach der Trocknung direkt als Emulgatoren 20 in Standardverfahren zur Herstellung von Margarine oder Backmischungen verwendet werden. Dabei ist keine Zugabe weiterer Komponenten wie z.B. zusätzlicher Mono- oder Diacylglyceride notwendig.

Neben dem Verfahren selbst und den damit hergestellten Gemischen 25 beansprucht die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der mit dem Verfahren herstellbaren Gemische zur Herstellung von Emulsionen und Cremes im Lebensmittelbereich, insbesondere in Form von Eiscremes, Margarinen und Backwaren, und im Kosmetikbereich.

30 Im Rahmen dieser Erfindung wurde schließlich gefunden, dass die Produkte und damit der Emulgator im Gegensatz zu bisher erhältlichen Emulgatoren, die durch Mischung der reinen Lysolecithin- und Mono-/Diacylglycerid-Bestandteile hergestellt werden, auch in flüssiger Form vorliegen können

- 9 -

und die deshalb ohne weitere Bearbeitung leicht verwendbar sind, ohne dabei Qualitätseinbußen zu erleiden.

Mit dem beanspruchten Verfahren gelingt durch die gleichzeitige enzymatische Umsetzung von Phospholipiden (Lecithin) und Triacylglyceriden (Öl) zu Lysophospholipiden und Mono-/Diacylglyceriden auf einfache Weise die Herstellung von Emulgatoren. Die Umsetzung von Lecithin in Lysolecithin erfolgt dabei über eine enzymatische Hydrolyse, ohne dass hierfür organische Lösemittel, Polyole und/oder Calcium zugesetzt werden müssen, oder dass ein Wasseranteil > 15 Gew.-% verwendet werden muss. Darüber hinaus ist im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eine exakte Einstellung der Anteile einzelner Lipidkomponenten im Produkt zielgenau möglich, indem ausgewählte Eingangsparameter variiert werden. Schließlich ist ein weiterer Vorteil der Erfindung darin zu sehen, dass die so erhaltenen Emulgatoren auch direkt in flüssiger Form gewonnen werden können.

Bei dem beschriebenen Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Mono- und Diacylglycerid-haltigen Emulgatoren wird in einem ersten Verfahrensschritt a) eine Mischung aus einer Phospholipid- und einer Triacylglycerid-Komponente vorgelegt, anschließend im Verfahrensschritt b) zu der so erhaltenen Mischung eine solche Menge einer (Phospho-) Lipase-haltigen wässrigen Lösung gegeben, dass der Wassergehalt der Mischung zwischen 3 und 15 Gew.-% beträgt. Anschließend wird im Verfahrensschritt c) die aus dem vorhergehenden Schritt erhaltene Mischung bei Temperaturen zwischen 20° und 80°C über einen Zeitraum von mindestens zwei Stunden zur Reaktion gebracht und abschließend wird diese Mischung getrocknet. Als besonders geeignete Komponenten haben sich Soja-Rohlecithin und pflanzliche und/oder tierische Öle gezeigt, die gemeinsam mit einer Mischung aus Lipase und/oder Phospholipase als Enzym-Komponente umgesetzt werden. Mit diesem Verfahren, das ohne die sonst üblichen organische Lösemittel, Polyole oder ionischen Zusätze sowie mit geringem Wasseranteil auskommt, werden Emulgatoren erhalten, deren

- 10 -

Zusammensetzung aus Lysophospholipiden und Mono-/Diacylglyceriden gezielt eingestellt werden können. Ihren Einsatz finden diese Emulgatoren, die auch in flüssiger Form erhältlich sind, im Lebensmittel- und Kosmetikbereich.

5

Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die genannten Vorteile des beanspruchten Verfahrens zur enzymatischen Herstellung von Emulgatoren.

10 Beispiele

Das in den nachfolgenden Beispielen verwendete Rohlecithin stammte von Honeymead, USA; beim Sojaöl handelte es sich um freierwerbbare, handelsübliche Waren.

15 Die Zusammensetzung der jeweils erhaltenen Produkts wurde mithilfe der HPLC, HPTLC und mit gravimetrischen Methoden analysiert. Für die HPLC wurde als stationäre Phase eine Kieselgel Si60 Säule verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus n-Hexan / 2-Propanol / Wasser (0,25 / 4 / 1 [v/v/v]) zusammen, die mit einer Flussrate von 1,2 mL / min über 20 die Säule gegeben wurde. Anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten konnte der Gehalt an Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin quantifiziert werden. Die Proben wurden zuvor in n-Hexan / 2-Propanol (2 / 1 [v/v]) gelöst.

25 Die HPTLC wurde mit Kieselgel Si60, aufgebracht auf eine Glasplatte (Format 20x10 cm), als stationäre Phase durchgeführt. Als mobile Phase diente Diethylether / Petroleumbenzin / Eisessig im Verhältnis 40 / 59 / 1 [v/v/v]. Nach dem Analysenlauf und Trocknen der Platte wurden die erhaltenen Banden mit einer Kupfer-(II)-sulfat Lösung (10 Gew.-% Kupfersulfat gelöst in 8%-iger Phosphorsäure) derivatisiert und der Gehalt 30 an Monoacylglyceriden sowie an 1,2- und 1,3-Diacylglyceriden quantifiziert. Die Proben wurden zuvor in Chloroform gelöst.

Die gravimetrische Methode wurde zur Bestimmung des Acetonunlöslichen eingesetzt. Hierbei wurde die Probe mit Aceton versetzt, der erhaltene

- 11 -

Rückstand abgetrennt, getrocknet und gewogen.

Beispiel 1

5

45 g Rohlecithin wurden mit 55 g Sojaöl gemischt und bei einer Temperatur von 47,5°C gerührt. 0,13 g Lipase aus *Candida cylindracea* (von Biocatalysts, UK) wurden in 9 g Wasser gelöst und anschließend unter Röhren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben. Diese Mischung wurde bei 10 47,5°C gerührt und nach einer Reaktionszeit von 8,5 h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer Temperatur von 80°C getrocknet.

Ergebnis: Das erhaltene Produkt enthielt 28 Gew.-% Acetonunlösliches, was einem Lecithinanteil von 43% entspricht, und ferner 2 Gew.-% Lysophosphatidylcholin, 4,5 Gew.-% Monoacylglyceride und 11 Gew.-% Diacylglyceride. Das Verhältnis Lecithin zu Mono-/Diacylglyceride betrug 15 1 : 0,34.

Beispiel 2

20

135g Rohlecithin wurden mit 165g Sojaöl und 27g Wasser gemischt und bei einer Temperatur von 47,5°C gerührt. 0,15g Lipase aus *Candida cylindracea* wurden unter Röhren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben. Diese Mischung wurde bei 47,5°C gerührt und nach einer Reaktionszeit von 8,5h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer Temperatur von 80°C 25 getrocknet.

Ergebnis: Das erhaltene Produkt enthielt 27 Gew.-% Acetonunlösliches, was einem Lecithinanteil von 42% entspricht, und ferner 2,5 Gew.-% Lysophosphatidylcholin, 5 Gew.-% Monoacylglyceride und 10 Gew.-% 30 Diacylglyceride. Das Verhältnis Lecithin zu Mono-/Diacylglyceride betrug 1 : 0,36.

- 12 -

Beispiel 3

- 10g Rohlecithin wurden mit 90g Sojaöl gemischt und bei einer Temperatur
5 von 35°C gerührt. 0,1g Lipase aus *Candida cylindracea* wurde in 12g
Wasser gelöst und anschließend unter Röhren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch
gegeben. Diese Mischung wurde bei 35°C gerührt und nach einer
Reaktionszeit von 15h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer
Temperatur von 60°C getrocknet.
- 10 Ergebnis: Das erhaltene Produkt enthielt 6 Gew.-% Acetonunlösliches, was
einem Lecithinanteil von 9,5% entspricht, und ferner 0,2 Gew.-%
Lysophosphatidylcholin, 4 Gew.-% Monoacylglyceride und 10 Gew.-%
Diacylglyceride. Das Verhältnis Lecithin zu Mono-/Diacylglyceride betrug
1 : 1,5.

15

Beispiel 4

- 30g Rohlecithin wurden mit 270g Sojaöl gemischt und bei einer Temperatur
20 von 60°C gerührt. 0,3g Lipase aus *Candida cylindracea* wurden in 18g
Wasser gelöst und anschließend unter Röhren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch
gegeben. Diese Mischung wurde bei 60°C gerührt und nach einer
Reaktionszeit von 15h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer
Temperatur von 80°C getrocknet.
- 25 Ergebnis: Das erhaltene Produkt enthielt 6 Gew.-% Acetonunlösliches, was
einem Lecithinanteil von 9,5% entspricht, und ferner 0,2 Gew.-%
Lysophosphatidylcholin, 2 Gew.-% Monoacylglyceride und 12 Gew.-%
Diacylglyceride. Das Verhältnis Lecithin zu Mono-/Diacylglyceride betrug
1 : 1,5.

30

- 13 -

Beispiel 5

70g Rohlecithin wurde mit 30g Sojaöl gemischt und bei einer Temperatur von 35°C gerührt. 0,1g Lipase aus *Candida cylindracea* wurden in 12g

5 Wasser gelöst und anschließend unter Rühren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben. Diese Mischung wurde bei 35°C gerührt und nach einer Reaktionszeit von 2h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer Temperatur von 60°C getrocknet.

Ergebnis: Das erhaltene Produkt wies einen Anteil Acetonunlösliches von

10 ca. 45 Gew.-% auf und es enthielt 3 Gew.-% Lysophosphatidylcholin, 6,5 Gew.-% Monoacylglyceride und 9 Gew.-% Diacylglyceride.

Beispiel 6

15

75g Rohlecithin wurden mit 25g Sojaöl gemischt und bei einer Temperatur von 47,5°C gerührt. 0,05g Lipase aus *Candida cylindracea* wurden in 9g Wasser gelöst und anschließend unter Rühren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben. Diese Mischung wurde bei 47,5°C über einen Zeitraum von 8,5h

20 gerührt und anschließend unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer Temperatur von 80°C getrocknet.

Ergebnis: Das erhaltene Produkt wies einen Anteil Acetonunlösliches von ca. 50 Gew.-% auf und es enthielt 4 Gew.-% Lysophosphatidylcholin, 5 Gew.-% Monoacylglyceride und 6 Gew.-% Diacylglyceride.

25

Beispiel 7

225g Rohlecithin wurden mit 275g Sojaöl gemischt und bei einer Temperatur von 47,5°C gerührt. 0,25g Lipase aus *Candida cylindracea* wurden in 70g Wasser gelöst und anschließend unter Rühren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben. Diese Mischung wurde bei 47,5°C gerührt und nach einer Reaktionszeit von 8,5h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer

- 14 -

Temperatur von 60°C getrocknet.

Ergebnis: Das erhaltene Produkt wies einen Anteil Acetonunlösliches von ca. 30 Gew.-% auf und es enthielt 2 Gew.-% Lysophosphatidylcholin, 6 Gew.-% Monoacylglyceride und 8,5 Gew.-% Diacylglyceride.

5

Beispiel 8

70g Rohlecithin wurden mit 30g Sojaöl gemischt und bei einer Temperatur von 60°C gerührt. 0,1g Lipase aus *Aspergillus niger* wurden in 12g Wasser gelöst und anschließend unter Rühren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben. Diese Mischung wurde bei 60°C gerührt und nach einer Reaktionszeit von 15h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer Temperatur von 60°C getrocknet.

Ergebnis: Das erhaltene Produkt wies einen Anteil Acetonunlösliches von ca. 45 Gew.-% auf und es enthielt 3 Gew.-% Lysophosphatidylcholin, 5 Gew.-% Monoacylglyceride und 10 Gew.-% Diacylglyceride.

20 Beispiel 9

70g Rohlecithin wurden mit 30g gehärtetem Palmfett gemischt und bei einer Temperatur von 45°C gerührt. 0,05g Lipase aus *Candida cylindracea* wurden in 10g Wasser gelöst und anschließend unter Rühren zu dem Lecithin/Öl-Gemisch gegeben. Diese Mischung wurde bei 45°C gerührt und nach einer Reaktionszeit von 8h unter einem Vakuum von 0,1 bar und bei einer Temperatur von 60°C getrocknet. Anschließend wurde das Produkt abgekühlt und auskristallisiert.

Ergebnis: Der Emulgator enthielt einen Anteil Acetonunlösliches von ca. 45 Gew.-% und ferner 3 Gew.-% Lysophosphatidylcholin, 5 Gew.-% Monoacylglyceride und 10 Gew.-% Diacylglyceride.

- 15 -

Beispiel 10 (Anwendungsbeispiel)

Der nach Beispiel 9 hergestellte Emulgator wurde in einem Standardverfahren für die Herstellung von Margarine nach folgender Rezeptur eingesetzt:

5	47,5 Gew.-%	Sojaöl
	31,5 Gew.-%	Palmöl
	19,8 Gew.-%	Wasser
	0,1 Gew.-%	Kochsalz
10	0,07 Gew.-%	Molkenprotein
	0,03 Gew.-%	Citronensäure
	1,0 Gew.-%	Emulgator

Ergebnis: Es wurde eine Margarine erhalten, die in Bezug auf Textur, Schmelzverhalten und Streichfähigkeit Standardmargarinen gleichzusetzen ist.

Ansprüche

1. Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Mono- und Diacylglycerid-haltigen Emulgatoren, dadurch gekennzeichnet, dass

- 5 a) eine Mischung aus einer Phospholipid- und einer Triacylglycerid-Komponente vorgelegt wird,
- 10 b) zu der Mischung aus Verfahrensschritt a) eine solche Menge einer (Phospho-)Lipase-haltigen wässrigen Lösung gegeben wird, dass der Wassergehalt der Mischung zwischen 3 und 15 Gew.-% beträgt, anschließend
- 15 c) die aus Verfahrensschritt b) erhaltene Mischung bei Temperaturen zwischen 20° und 80°C über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden zur Reaktion gebracht wird, und anschließend
- d) die Mischung nach dem Reaktionsende getrocknet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Phospholipid-Komponente ein Lecithin, vorzugsweise Rohlecithin und besonders bevorzugt ein Soja-Rohlecithin, verwendet wird.

25 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Triacylglycerid-Komponente ein pflanzliches und/oder tierisches Öl, vorzugsweise in raffinierter und/oder mind. teilweise gehärteter Form, eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahrensschritt a) eine Mischung mit einem Phospholipid-Komponenten-Anteil zwischen 10 und 80 Gew.-% vorgelegt wird.

30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahrensschritt a) eine Mischung mit einem Triacylglycerid-Komponenten-Anteil zwischen 20 und 90 Gew.-% vorgelegt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
dass die Mischung im Verfahrensschritt a) auf eine Temperatur zwischen
35° und 60°C gebracht wird.

5

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
dass im Verfahrensschritt b) eine Lipase- und/oder Phospholipase
mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus *Candida* und/oder *Aspergillus*
eingesetzt wird.

10

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet,
dass eine (Phospho-)Lipasemenge von 0,05 bis 10 mg/ml verwendet
wird.

15

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
dass im Verfahrensschritt c) eine Temperatur zwischen 40° und 50°C
eingestellt wird.

20

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
dass die Reaktionsdauer im Verfahrensschritt c) zwischen 5 und 20
Stunden und besonders bevorzugt zwischen 8 und 12 Stunden beträgt.

25

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet,
dass der Trocknungsschritt d) bei Temperaturen zwischen 60° und 80°C
und besonders bevorzugt im Vakuum durchgeführt wird.

30

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet,
dass ein Mischung aus Lysolecithin, Mono- und Diacylglyceriden in
bevorzugten Anteilen zwischen 3,0 und 75 Gew.-% Lysolecithin, 2,0 bis
20 Gew.-% Monoacylglyceriden und 6,0 bis 40 Gew.-% Diacylglyceriden
erhalten wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet,

- 18 -

dass ein Gemisch mit einem Verhältnis Phospholipid-Komponente : Mono- und Diacylglycerid-Komponente von 1 : 0,25 bis 4,0 erhalten wird.

14. Verwendung des nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlichen
5 Gemischs zur Herstellung von Emulsionen und Cremes im Lebensmittelbereich, insbesondere in Form von Eiscremes, Margarinen und Backwaren, und im Kosmetikbereich.